



B-53

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63144245 A**(43) Date of publication of application: **18.06.88**

(51) Int. Cl.

**G01N 27/30**  
**G01N 27/46**(21) Application number: **61291061**(22) Date of filing: **05.12.86**(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**(72) Inventor: **KAWAGURI MARIKO**  
**NANKAI SHIRO**  
**SUGIHARA HIROKAZU**  
**IJIMA TAKASHI**(54) **BIOSENSOR**

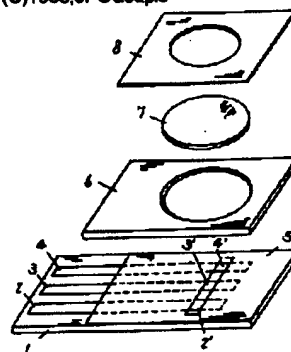
(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a stable biosensor of uniform quality by installing and uniting a porous body which holds oxidoreductase and electron acceptors on an electrode plate selected by measuring the electric characteristics.

**CONSTITUTION:** Conductive carbon paste is printed in parallel belts on an insulating substrate 1, and heated and dried to form an electrode system consisting of a counter electrode 2, a measurement electrode 3, and a reference electrode 4. Then, the electrode system is covered partially and an insulating layer 5 is formed by printing insulating paste so that parts 2'W4' of the respective electrodes which perform electrochemical operation are left; and the exposed parts 2'W4' are polished and a heat treatment is carried out. The electrode system uses only an electrode system which is uniform in response by taking a measurement as well as preliminary measurement using inspection liquid. Then, a holding frame 6 made of synthetic resin is adhered to the insulating layer 5 and the porous body 7 which carries enzyme and electron acceptors is held in a hole so that the electrode systems 2'W4' are covered, further, a cover 8 which is made of resin and has an

opening part with a diameter smaller than the external diameter of the porous body 7 is adhered to unit the whole body.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&amp;Japio



## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-144245

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)6月16日

G 01 N 27/30  
27/46J-7363-2G  
M-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサ

⑮ 特 願 昭61-291061

⑯ 出 願 昭61(1986)12月5日

⑰ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	杉 原 宏 和	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉑ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑳ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
㉒ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

バイオセンサ

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 絶縁性基板上に少なくとも測定極と対極を形成して電極板とし、前記電極板上被検液測定に必要な電子受容体を含む検査用液を付着させ、前記測定極と対極間の電気的特性に測定して前記電極板を選別し、選別した電極板上に接して、酸化還元酵素と前記電子受容体を保持する担体を載置して一体化したことを特徴とするバイオセンサ。
- (2) 検査液は電子受容体の酸化型および還元型を水溶液にとかしたものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (3) 検査液は電子受容体にタンパク質を加えたものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

## 3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明になるバイオセンサは生体試料中の特定成分を高精度で迅速かつ容易に定量でき医療分野や食品工学などに幅広く応用できる。

## 従来の技術

近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のバイオセンサが開発され、特に臨床検査分野への応用が試みられている。検査項目及び検体数が増加している現在、迅速に精度よく測定できるバイオセンサが望まれている。

グルコースセンサに例をとると、糖尿病の増加が激しい今日、血液中の血糖値を測定し管理するには、以前のように血液を遠心分離し血漿にして測定するのでは非常に時間がかかるため、全血で測定できるセンサが要求されている。簡易型としては、尿検査の時に使用されている検査紙と同様に、スティック状の支持体に糖(グルコース)にのみ反応する酵素および酵素反応時又は酵素反応の生成物により変化する色素を含有する担体を設置したものがある。この担体に血液を添加し、一定時間後の色素の変化を目視又は光学的に測定する

方式であるが、血液中の着色物による妨害が大きいく精度は低い。

そこで、第5図のような多層式の分析担体が提案されている(実開昭54-178495号公報)。これは透明な支持体9の上に試薬層10、展開層11、防水層12、伊過層13が順に積層した構造となっている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず伊過層13により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層12にある小孔14から展開層11へ均一に浸透し、試薬層10において反応が進行する。反応終了後、透明な支持体9を通して矢印の方向から光をあて、分光分析により基質濃度を測定する方式である。従来の簡易なスティック状の担体にくらべ、複雑な構造であるが、血球除去などにより精度は向上した。しかし、血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層12が必要となったり、反応を速めるために高温でインキュベートする必要があり、装置および担体が複雑化するという問題がある。

液などを測定した後は、電極表面に付着した蛋白質等が水洗だけでは完全に除去できないため応答の劣化をまねき測定の精度に影響を与えた。

#### 問題点を解決するための手段

本発明は、上記問題点を解決するため、絶縁性の基板に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素および電子受容体を担持した多孔体と一体化した。さらに、電極系については、あらかじめ少なくとも前記電子受容体を含む検査液で測定時と同様に測定を行ない応答のそろったもののみ使用するものである。

#### 作用

電極系および酵素と電子受容体を含む多孔体が一体化されているため、測定毎に電極も含めて取り替えるので測定操作は試料の滴下のみという極めて簡易となった。応答には測定極の面積が左右するが、あらかじめ電子受容体を含む検査液で応答のそろった電極を選別しているため、精度の良い応答が得られた。

#### 実施例

一方、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などの操作を行うことなく高精度に定量する方式としては、第6図に示す様なバイオセンサが提案されている(例えば、特開昭59-166852号公報)。このバイオセンサは、絶縁基板15にリード18、19をそれぞれ有する白金などからなる測定極16および対極17を埋設し、これらの電極系の露出部分を酸化還元酵素および電子受容体を担持した多孔体20で覆ったものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、試料液に多孔体中の酸化還元酵素と電子受容体が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

#### 発明が解決しようとする問題点

従来の構成では、多孔体は測定毎に取り替えることにより簡単に測定することができるが、電極系については洗浄等の操作が必要となる。特に血

#### (実施例1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、構成部分の分解図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを平行な帯状に印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、測定極3、参照極4からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'(各1mm)を残す様に、ポリエステル主体の絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱処理して絶縁層5を形成する。次に、露出した2'、3'、4'の各部分を研磨後、空気中で100℃にて4時間熱処理を施した。

検査液としてフェリシアン化カリウムとフェロシアン化カリウムをpH 5.6のリン酸緩衝液に溶かして0.1Mの等モル溶液を作成し、電極上2'、3'、4'上に30μl添加した。参照極4'を基準に

して700 mVのパルス電圧を印加すると、フェロシアン化カリウムが測定極3'上で酸化され酸化電流が流れる。この酸化電流は、フェロシアン化カリウムの濃度が一定の場合は、測定極3'の面積に影響されるため、スクリーン印刷で複数の電極系を作成した時の各々の測定極の面積をチェックすることができる。測定極は、1 mmと非常に小さいため、目視又は顕微鏡を用いても面積の差は判断しにくい。しかも、電極の表面は平滑ではなく、印刷の条件(温度、湿度、樹脂バインダーとの混合状態)により表面状態がかわるため、測定前に検査する必要がある。上記の方法を用いれば簡単に表面状態を検査でき水洗して乾燥した後、応答のそろった電極のみを測定に使えるので測定精度が向上した。

選別した電極上に穴を開けたポリエステル等の合成樹脂製の保持枠6を絶縁層5に接着し、前記電極系2', 3', 4'を覆う様に酵素および電子受容体を担持した多孔体7を穴の中に保持する。さらにこの多孔体7の外径より小さい径の開孔部を有

リウムを生成する。そこで、上記のアノード方向へのパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウム濃度に比例した酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコース濃度に対応する。

第3図は、上記構成のセンサの応答特性の一例として、電圧印加10秒後の電流値と、グルコース濃度との関係を示すものであり、極めて良好な直線性を示した。

#### (実施例2)

実施例1に用いた検査液にグルコースオキシダーゼを10 mg/100 加え、実施例1と同様に各電極の応答電流を調べ電極の選別を行なった。この電極上に実施例1と同様にグルコースセンサを構成した。上記構成による10個のグルコースセンサに約90 mg/dl のグルコースを含む血清サンプルを各々滴下し、2分後に700 mVのパルス電圧を印加し実施例1と同様に測定したところ第4図中Aに示す様に良好な再現性を示した。一方、グルコースオキシダーゼを含まない検

する樹脂製カバー8を接着し、全体を一体化する。この一体化されたバイオセンサについて、測定極3に沿った断面図を第2図に示す。上記で用いた多孔体は、ナイロン不織布を基材とし、酸化還元酵素としてのグルコースオキシダーゼ200 mgと、電子受容体としてのフェリシアン化カリウム400 mgを、濃度0.25 wt %の界面活性剤(ポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル)を含むpH 5.6のリン酸緩衝液1 mlに溶解した液を前記基材に含浸後、濃度0.25 wt %の界面活性剤を含むエタノール中に浸漬して結晶化し、次に減圧乾燥して作製したものである。

上記の様に構成したグルコースセンサの多孔体へ試料液としてグルコース標準液を滴下し、滴下2分後に参照極を基準にして700 mVのパルス電圧を印加することにより、測定極をアノード方向へ分極した。

この場合、添加されたグルコースは多孔体7に担持されたグルコースオキシダーゼの作用でフェリシアン化カリウムと反応してフェロシアン化カ

ライドで選別した電極で構成したグルコースセンサに血清サンプルを滴下し前記と同様に測定した場合は、第4図中Bに示すように、Aに比較して応答電流の変動が大であった。この差は、血清サンプル中の蛋白質等の吸着物質が電極へ吸着するためと考えられる。そこで、あらかじめグルコースオキシダーゼを含んだ検査液で電極の応答を調べれば、グルコースオキシダーゼが電極表面に吸着され、血清サンプル中の蛋白質が吸着するのを防ぐことができる。

グルコースオキシダーゼのかわりにアルブミンを10 mg/100 加えて選別した電極についても良好な再現性を示した。

検査液に含ませる蛋白質としては、上記実施例に示したグルコースオキシダーゼやアルブミンに限定されることはない。

前記実施例においては、電極系として3電極方式の場合について述べたが、対極と測定極からなる2電極方式でも測定は可能である。

多孔体に担持させたり検査液に含まれる電子受

容体としては、前記実施例で用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので選んでいるが、 $p$ -ベンゾキノンを使えば、反応速度が早いので高速化に適している。又、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジメトサルフェート、 $p$ -ナフトキノン4-スルホン酸カリウムなども使用できる。

なお、上記実施例におけるセンサはグルコースに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素としてはグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ等も用いることができる。

#### 発明の効果

被検液測定に必要な電子受容体を含んだ検査液を電極板上に付着させて電気的特性を測定し、それによって選別した電極板上に酸化還元酵素と前記電子受容体を保持した担持板を設置し一体化すると

とにより、安定かつ品質の揃ったバイオセンサを得ることができる。

#### 4、図面の簡単な説明

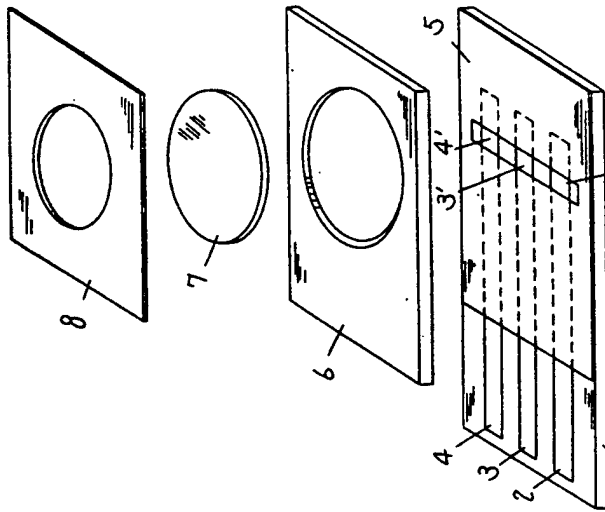
第1図は本発明の一実施例の製造法になるグルコースセンサの模式図、第2図は第1図の縦断面図、第3図と第4図は同グルコースセンサの応答特性図、第5図と第6図は従来例のバイオセンサの断面図である。

1……基板、2……対極、3……測定極、4……参照極、5……絶縁層、6……保持枠、7……多孔体、8……樹脂製カバー。

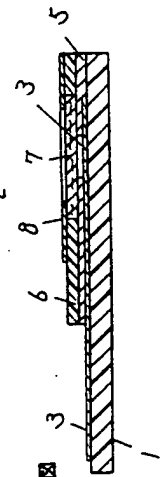
代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

1……基板  
2……対極  
3……測定極  
4……参照極  
5……絶縁層  
6……保持枠  
7……多孔体  
8……樹脂製カバー

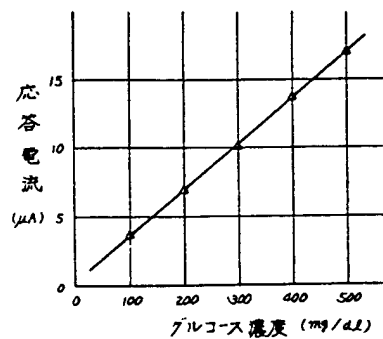
第1図



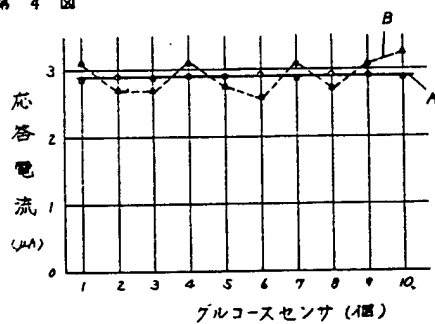
第2図



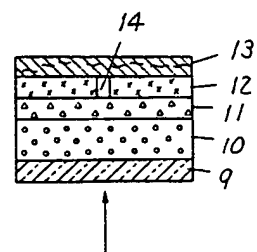
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

